

524,270

Rec'd PCT/PTO

09 FEB 2005

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004年2月26日 (26.02.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/016814 A1

(51) 国際特許分類: C12Q 1/68, C12N 15/09, G01N 33/50

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/001475

(22) 国際出願日: 2003年2月13日 (13.02.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-235029 2002年8月12日 (12.08.2002) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 滋賀医科大学が代表する日本国 (JAPAN AS REPRESENTED BY SECRETARY OF SHIGA UNIVERSITY OF MEDICAL SCIENCE) [JP/JP]; 〒520-2192 滋賀県 大津市 瀬田月輪町 Shiga (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 佐藤 浩 (SATO, Hiroshi) [JP/JP]; 〒525-0072 滋賀県 草津市 笠山7丁目3番D-301号 Shiga (JP). 藤山 佳秀 (FUJIYAMA, Yoshihide) [JP/JP]; 〒520-0865 滋賀県 大津市 南郷2丁目4-1-22 Shiga (JP). 山本 和雄 (YAMAMOTO, Kazuo) [JP/JP]; 〒520-3034 滋賀県 栗東市 小平井2-4-8 Shiga (JP).

(74) 代理人: 庄司 隆 (SHOJI, Takashi); 〒101-0032 東京都千代田区岩本町3丁目2番10号 SN岩本町ビル6階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

規則4.17に規定する申立て:

— すべての指定国のための不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て (規則4.17(v))

添付公開書類:

— 国際調査報告書
— 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF ESTIMATING DRUG METABOLIC ACTIVITY BY ANALYZING MUTATIONS IN GLUCURONOSYL TRANSFERASE GENE

(54) 発明の名称: グルクロン酸転移酵素遺伝子の変異解析による薬剤代謝活性の予測方法

(57) Abstract: It is intended to provide a method of judging, estimating or examining drug metabolism by effectively detecting mutations in a gene encoding UGT. Since a gene encoding UGT is made up of 5 exons and exons 2 to 5 are common in each UGT1 isoform, effective mutations in the UGT1 gene is examined by examining mutations in the common regions (in particular, mutations in the exon 5) and further detecting mutations in plural exon regions. To examine the mutations, use is made of nucleic acid chips with nucleic acid probes.

(57) 要約: 本発明の課題はUGTをコードする遺伝子の変異を有効的に検出することにより、薬剤代謝の判定、予測又は検査方法を提供することである。UGTをコードする遺伝子が5個のエキソンから成り、エキソン2~5領域はUGT1のアイソフォーム毎に共通の領域であることから、共通領域の変異、とりわけエキソン5領域の変異を検査し、さらに複数のエキソン領域の変異検出を加えることにより、効果的なUGT1遺伝子の変異を検査する。変異検査の手段としては、核酸プローブを用いた核酸チップが用いられる。

WO 2004/016814 A1

明 細 書

グルクロン酸転移酵素遺伝子の変異解析による薬剤代謝活性の予測方法

5

技術分野

本発明は臨床検査の分野で用いられ、とりわけグルクロン酸抱合に関与する酵素の遺伝子検査の方法およびそのためのプローブおよびキットに関する。

10

背景技術

ウリジン・ジホスフェートグルクロノシルトランスフェラーゼ (UDP-glucuronosyltransferase, UGT) は種々の薬剤のグルクロン酸抱合を触媒する酵素である。UGTはそのアミノ酸配列の相同性によりUGT1とUGT2の2つのファミリーに分類される。

15

UGT1には、UGT1A1およびUGT1A3～UGT1A10の少なくとも9個のアイソフォームが存在する事が知られている。例えば、UGT1A1はビリルビン、アミン、フェノールなどを抱合し、UGT1A6は平面状の分子構造をもつフェノールを抱合する。ヒトUGT1

20 遺伝子 (UGT1) は染色体2q37に存在しており、アイソフォーム (1A1～1A10) ごとに基質特異性のあるエキソン1と、各アイソフォームで共通のエキソン2～5からなり、各エキソン1の上流にTATA boxを含むプロモーター領域が存在する。それぞれのアイソフォームは第1エキソン群の少なくとも9のうちの1つによりコードされる

25 ユニークなアミノ末端領域と4つのエキソンによってコードされる共通のカルボキシ末端領域を持っている。

一方UGT 2は臭気物質を抱合するUGT 2 Aと胆汁酸、ステロイドを抱合するUGT 2のサブファミリーに分けられる。

血清ビリルビンが高値となる以外に一般肝機能検査に異常がなく、明らかな黄疸の原因(溶血所見など)を認めないものを体質性黄疸と称し、
5 間接(非抱合型)ビリルビンが上昇する Crigler-Najjar 症候群 I 型, 同 II 型および Gilbert 症候群と、直接(抱合型)ビリルビンが上昇する Dubin-Johnson 症候群, Rotor 症候群とに大別される。Crigler-Najjar 症候群 I 型, 同 II 型および Gilbert 症候群ではUGT 1 A 1 遺伝子のエキソン5での変異が報告されている。具体的にはアミノ酸配列番号48
10 6番目のチロシンがアスパラギン酸に置換した変異(Y486D)により、その酵素活性が正常のものに比べて13分の1に低下する。

一方、体内での薬剤代謝に関与する物質として、チトクロームP450が良く知られている。そしてこの酵素の多型の違いにより、ある特定の薬剤が代謝されない、薬剤代謝異常が引き起こされることもよく知ら
15 れている。薬剤の代謝異常はチトクロームP450の多型によるのみならず、上述のごとく薬剤がグルクロン酸抱合されて代謝されることから、薬剤代謝にUGTの多型の関与が知られるようになった。しかしながら、種々の薬剤代謝とUGTの多型との関係において、数多くの薬剤に対する代謝を反映しうる有効な遺伝子の変異は明らかでない。とりわけUG
20 T 1 遺伝子のエキソン5領域の変異と薬剤代謝の関連は明らかでない。

発明の開示

(解決しようとする課題)

本発明の課題は、UGTをコードする遺伝子の変異を効率的に検出することにより、薬剤代謝の判定、予測または検査方法を提供することである。
25

(課題を解決する手段)

本発明者らは鋭意研究を重ねた結果、UGTをコードする遺伝子が5個のエキソンから成り、エキソン2～5領域はUGT1のアイソフォーム毎に共通の領域であることから、これらの領域の変異を調べると、UGT1のアイソフォーム毎の検査をすることなく、UGT1の変異を有効的に検出しうることに着目し、とりわけUGT1分子のエキソン5領域の変異を検出することで、薬物代謝の予測が有効になされることを見出し、本発明を完成するに至った。

10 すなわち本発明は、

1. UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ (UGT) をコードする遺伝子のエキソン5領域の変異を検出する工程を含むことを特徴とするUGTの薬剤代謝能に対する検査方法、
2. プロモーター領域のTATA boxに存在するTAの繰り返し配列
15 の増加または減少の変異を検出する工程を組み合わせてなる前項1に記載の検査方法、
3. UGT1をコードする遺伝子を含む試料を、UGT1A1、UGT1A3、UGT1A4、UGT1A5、UGT1A6、UGT1A7、UGT1A8、UGT1A9およびUGT1A10の各アイソフォーム
20 毎の検査をすることなく、該各アイソフォームに共通の核酸配列を有するエキソン5領域の変異を検出する工程を含む前項1または2に記載の検査方法、
4. UGT1A1分子のアミノ酸配列486番目のアミノ酸をコードするUGT遺伝子配列の1456番目の塩基に対応するUGT1A分子の
25 各アイソフォームのエキソン5領域の変異を検出する工程を含む前項3に記載の検査方法、

5. 上記変異の検出工程とともに、U G T分子をコードする遺伝子配列のエキソン1、2、3および4の領域の少なくとも1つの領域の変異を検出する工程を含む前項1～4のいずれか1に記載の検査方法、
6. U G T 1 A 1分子のアミノ酸配列71番目のアミノ酸をコードする
- 5 U G T遺伝子配列の226番目の変異およびアミノ酸配列229番目のアミノ酸をコードする遺伝子配列の486番目の変異のうち少なくとも1つの遺伝子配列の変異を検出する工程を含む前項5に記載の検査方法、
7. 前項3または4に記載の塩基置換からなる変異を有するU G T遺伝子または該変異を含む遺伝子の断片、
- 10 8. 前項1～6のいずれか1に記載の塩基置換の検出方法に供される被検DNAとしての機能的有効長を有するDNA断片または前項1～6に記載の塩基置換を検出方法に使用するためのプローブとしての機能的有効長を有するDNA断片、
9. 配列番号1～3のいずれか1で表される塩基配列を有するU G Tに
- 15 特異的なオリゴヌクレオチドプローブである前項7または8記載のDNA断片。
10. 配列番号1で表される塩基配列を有するプローブと配列番号2および／または3で表される塩基配列を有するプローブを組み合わせ使用する前項5または6に記載の検査方法、
- 20 11. 前項7～9のいずれか1に記載のオリゴヌクレオチドプローブまたは請求項10に記載の方法に用いるオリゴヌクレオチドプローブを同一の装置内に設置した検出装置。
12. 前項7～9のいずれか1に記載のオリゴヌクレオチドプローブの塩基配列の末端が、官能基を介して不溶性支持体に結合して固定化されている核酸チップまたは核酸アレイである前項11記載の検出装置
- 25 13. 前項11または12に記載の装置を用いて薬剤代謝を判定、予測

または検査する方法。

14. 前項1～6、10、13のいずれか1に記載の方法に用い、または前項7～9に記載の核酸断片或いは前項11または12に記載の装置を組み込んだ検査キット、からなる。

5

図面の簡単な説明

第1図はDNAチップの核酸プローブの配置を示した図である。

第2図は試料1（正常検体）の検査結果を表した図である。

第3図は試料2の検査結果を表した図である。

10 第4図は試料3の検査結果を表した図である。

第5図は試料4の検査結果を表した図である。

第6図は試料5の検査結果を表した図である。

第7図は試料6の検査結果を表した図である。

第8図は試料7の検査結果を表した図である。

15

発明を実施するための最良の形態

本発明を詳細に説明するため、実施態様を例示して説明する。

2-アミノ-5-ニトロ-4-トリフルオロメチルフェノールグルクロン酸抱合物は強い肝毒性を有する前立腺癌の治療に使われる非ステロ
20 イド系の抗男性ホルモン剤であるフルタアミドの主な代謝物である。

2-アミノ-5-ニトロ-4-トリフルオロメチルフェノールはUGTによってグルクロン酸抱合される。UGT1A1およびUGT1A6の各アイソフォームの酵素によりグルクロン酸抱合されるとき酵素反応学的な反応を、それぞれ正常な分子とY486Dの変異をもつ分子で
25 比較した。その結果、UGT1A1の変異型では天然型の最大速度に比べて約12%の最大速度を示し、Km値は2-アミノ-5-ニトロ-4

ートリフルオロメチルフェノールに対しては約半分であり、UDP-グルクロン酸に対しては天然型と同等であった。一方UGT1A6については変異型は天然型の1%以下の活性しか示さず、最大反応速度、 K_m の測定はともに不可能なレベルであった。

- 5 前述のようにUGT1遺伝子がアイソフォーム毎に共通のエキソン2～5領域とアイソフォーム毎に異なるエキソン1領域を有することから、共通エキソン領域に変異が起きるとすべてのアイソフォームにおいてUGT1の酵素活性が低下するといえる。

本発明は、共通エキソン領域の変異を調べることで、UGT1に存在
10 するアイソフォームの全てを対象に、遺伝子の変異を効率的に検査する方法を提供するものである。具体的には、例えばUGT1A1およびUGT1A6のエキソン5領域の変異(Y486D)を検査することにより、これらの酵素による薬物代謝を予測することができる。

さらに本発明は、UGT1のエキソン1領域の変異検出を加えること
15 により、各アイソフォームに固有の変異を検出し、それらを組み合わせることで、総合的にUGT遺伝子の変異の検出漏れの頻度を低減可能とするUGT遺伝子の変異検査方法が提供される。このことにより、薬剤代謝の予測、検査を効率的に行う方法が提供できる。

本発明は、UGT1A1のエキソン5領域の変異、具体的にはY48
20 6D変異の検査方法を開示するもので、該検査方法により、同時に起きている他のアイソフォームの変異も検出し得る。例えば、UGT1A3、UGT1A4並びにUGT1A5の変異であるY487D、UGT1A6の変異であるY485D、およびUGT1A7、UGT1A8、UGT1A9並びにUGT1A10の変異であるY483D等を同一のプロ
25 ープおよび／または同一の装置を使用して検査することができる。したがって、本発明の方法により、薬剤代謝に重要な働きをしているUGT

1 Aの各アイソフォームの変異を個々に検査することなく、1種の核酸プローブを用いることによって、これらアイソフォームの全てのエキソン5領域の変異を検出でき、その酵素活性の低下による薬剤代謝の判定、予測または検査を行うことが可能になる。

- 5 さらにUGT遺伝子のプロモーター領域に存在するTATA boxに存在するTA配列の繰返配列の増加又は減少を検出することによってUGTの薬剤代謝能の検出をより正確に検査することができる。通常、該TATA boxの領域には、TAの繰返配列は6箇所存在する。しかし、このTAの繰返配列の数が増加又は減少すると、UGTの薬剤代謝能に
- 10 影響が及ぶ。そこで、このTAの繰返配列数の増加又は減少に関する変異を検出することで、UGTの薬剤代謝能を検査することができる。具体的には、繰返配列数がヘテロ接合体の場合で4～8のいずれか及び4～8のいずれかの組合せとなる変異、又はホモ接合体の場合で4、5、7又は8となる変異を検出することでUGTの薬剤代謝能を検査すること
- 15 ができる。TATA boxの数の増加又は減少に関する変異の検出方法は、公知の方法により行うことができる。

- 本発明において、検出すべき遺伝子変異が明らかにされ、これが特定されているので、本発明の開示に従えば、その検出のための方法を適宜採用しもしくは該方法を適宜修飾して採用することは当業者であれば容
- 20 易である。例えば、被験者のUGT遺伝子を対象として、本発明の特定の変異（Y486D変異）の検出は、当該変異位置を含む塩基配列を解析する各種の方法に従うことができる。これには、例えばサザンハイブリダイゼーション法、ドットハイブリダイゼーション法（J. Mol. Biol., 98: 503-517, 1975 等参照）、ジデオキシ塩基配列決定法、DNAの増幅
- 25 手法を組合せた各種の検出法〔例えばPCR—制限酵素断片長多型分析法（RFLP: Restriction fragment length polymorphism）, PCR—単

鎖高次構造多型分析法 (Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 86: 2766-2770, 1989 等参照)、PCR-特異的配列オリゴヌクレオチド法 (SSO: Specific sequence oligonucleotide)、PCR-SSOとドットハイブリダイゼーション法を用いる対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド法
5 (Nature, 324: 163-166, 1986 等参照)]等を例示することができる。さらにオリゴヌクレオチドプローブを用いる核酸チップまたは核酸アレイによって簡便に検出することも可能である。

(プローブ)

10 UGT1分子をコードする遺伝子のエキソン1内226番目の核酸塩基の変異(G71R)、エキソン1内686番目の核酸塩基の変異(P229Q)の変異およびエキソン5内1456番目の核酸塩基の変異(Y486D)は、核酸プローブを用いて検出することができる。

これらの核酸プローブ用のDNA断片のヌクレオチド数は、少なくとも
15 も8個、通常10～50個、好ましくは15～35個の範囲にあるのがよい。プローブのヌクレオチド数が上記よりあまりに多くなりすぎると、1本鎖DNAにハイブリダイズしにくくなり、逆にあまりに小さすぎると、ハイブリダイゼーションの特異性が低下する。

具体的には、G71R変異検出用プローブとして、(配列番号2) TC
20 AGAGACNGAGCATTTTの塩基配列を有するオリゴヌクレオチド、P229Q変異検出用プローブは(配列番号3) TAATTCC
CNGTATGAAAの塩基配列を有するオリゴヌクレオチド、そして
Y486D変異検出プローブは(配列番号1) TGGTACCAGNA
CCATTCCCTの塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを使用するこ
25 とができる。この場合において、NはA、T、CまたはGの何れかもし
くはイノシン等のユニバーサル塩基である。

また、これらのオリゴヌクレオチドの末端には、必要な化学物質、例えば核酸アレイ調製時のスポットティングを容易にするための物質や、各種標識物質などを付加することができる。

- さらに本発明においては、UGT遺伝子検出用プローブとして機能し
- 5 得るものであれば、上記配列番号1～3に表される塩基配列を有するDNA断片に限定されず、鋳型鎖との間に少数のミスマッチがあっても良い。例えば、上記機能を有するものであれば、配列番号1～3に表される塩基配列に例えば2個以下のヌクレオチドの置換、欠失および／または付加による修飾のなされた配列を包含することができる。
- 10 上記本発明で用いるプローブの各オリゴヌクレオチドは、常法に従い、自動合成機、例えばDNAシンセサイザー（パーキンエルマー社）等を用いて容易に合成することができ、得られるオリゴヌクレオチドは更に必要に応じて、市販の精製用カートリッジ等を用いて精製することもできる。合成オリゴヌクレオチドはスライドガラス表面に固定化した核酸
- 15 アレイへ応用する場合には5'末端をアミノ標識しておくことも好適である。

（核酸アレイ）

- 上記の各プローブはスライドガラス等の表面に固定化して核酸アレイ
- 20 （一般には、「マイクロアレイ」ともいう。）として用いることができる。核酸アレイの手法は、公知の方法を適用することができ、特にその方法は限定されない（例えば遺伝子工学実験ノート下、羊土社、175-187 (2002)）。例えば、市販のアレイヤー、Affymetrix 417 Arrayerを用いてアミノシランコートしたスライドガラス上にスポット
- 25 トして調製することができる

(対象試料と検査試料の調製)

本発明の方法により、医薬品開発における動態試験において重要な位置を占めるグルクロン酸抱合による薬物代謝を容易に判定することができる。これにより、投与される医薬品の代謝の適否を判定することができる。測定の対象となる試料は生体試料であれば良く、特に限定されないが、例えば肝臓、腎臓、白血球、毛髪等の臓器、組織等が挙げられる。測定試料において、UGT遺伝子の発現量が少ない場合には、対象とする核酸をPCR法、LAMP法、LCR法、NASBA法等の適当な増幅方法により増幅させた試料を測定することも可能である。

- 10 検査対象試料からDNAを抽出し、変異を検出しようとする領域に特異的なプライマー対を用いて例えばPCR法によりDNAを増幅させて検査試料を調製することができる。具体的には、5'末端を蛍光標識したプライマー（例えば、5'-Cy3標識オリゴDNA）を用いて蛍光標識試料を調製することにより、調製した試料を核酸アレイ上のプローブと
- 15 ハイブリザイズさせて直接そのハイブリザイズした結果を検出することができる。

試料調製のためのプライマーとして、例えば以下のものを使用することができる。これにより、DNAを増幅させて蛍光標識試料を調製できる。

- 20 1) 変異検出部位G71R用のプライマー対：

G71R-F

(CTGCAGCAGAGGGGACATGA) (配列番号4)

Cy3-G71R-R

(Cy3-AACATTATGCCCGAGACTAAC) (配列番号

- 25 5)

- 2) 変異検出部位P229G用プライマー対：

P 2 2 9 Q - F

(C A A C C C A T T C T C C T A C G T G) (配列番号 6)

C y 3 - P 2 2 9 G - R

(C y 3 - A G A T G C A G A G C T C A A T A G G T C) (配列番号
5 7)

3) 変異検出部位 Y 4 8 6 D 用プライマー対

a) Y 4 8 6 D - F

(G C T G G A C C T G G C A G T G T T C) (配列番号 8)

C y 3 - Y 4 8 6 D - R

10 (C y 3 - T T T C C G G T A G C C A T A T G C A C A)
(配列番号 9)

b) Y 4 8 6 D - F 2

(C C G C A G C C C A C G A C C T C A C C T G G T)

(配列番号 1 0)

15 C y 3 - Y 4 8 6 D - R 2

(C y 3 - A G A G G A A A C C A A T C A C G T C C A A G G)

(配列番号 1 1)

(検出)

20 上記の核酸アレイ蛍光標識の検出には市販の検出装置が用いられる。

例えば A f f y m e t r i x 4 2 8 A r r a y S c a n n e r を用いて、
スキャンニングして各スポットの蛍光シグナルを検出することができる。

(対象薬剤)

25 本発明の方法によって検査されうる対象となる薬剤は、UGTにより
グルクロン酸抱合されるものであれば、その代謝の検査に有用である。

これらの薬剤の例として、スピロラクトン等の利尿剤、アセトアミノフェン、アスピリン、フロクタフェニン、インドメタシン等の鎮痛剤、ハロペリドール、カルピプラミン、ロラゼパム、アモキササン等の向精神薬、モルヒネ、プロポフォール、アヘン等の麻酔鎮痛剤、抗癌剤の塩酸
5 ドキソルピジン、鎮咳剤のリン酸コデイン、喘息治療薬の硫酸オルシブレナリン、抗てんかん剤のフェニトイン、抗ヒスタミン剤のフマル酸ケトチフェン、降圧および狭心症治療薬のカルベジロール、塩酸プロプラノロール等、脂質代謝改善剤のクロフィブラートアルミニウム、アルツハイマー治療薬の塩酸ドネペジル等が挙げられる。

10

(実施例)

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

15 (実施例 1 核酸アレイの調製)

配列番号 1 から 12 の各配列を持つ 5' アミノ修飾オリゴヌクレオチドを合成し、Affymetrix 417 Arrayer を用いて、アミノシランコートしたスライドガラス（シグマ社製）の表面にスポッティングし DNA チップを調製した。各オリゴヌクレオチドを 5 個ずつス
20 ポットした。調製したアレイのスポットレイアウトを図 1 に示した。

(実施例 2 試料の調製)

7 種類の検査試料を以下の 5'-Cy3 標識オリゴヌクレオチドと未標識オリゴヌクレオチドプライマーを用いて PCR 増幅させ、蛍光標識
25 試料を調製した。変異検出部位 G71R 用のプライマー対として、G71R-F と Cy3-G71R-R を用いて 150 塩基対の PCR 増幅産

物を、変異検出部位 P 2 2 9 G 用プライマー対、P 2 2 9 Q-F と C y 3-P 2 2 9 G-R を用いて 1 9 5 塩基対の P C R 増幅産物を、さらに変異検出部位 Y 4 8 6 D 用プライマー対、Y 4 8 6 D-F と C y 3-Y 4 8 6 D-R を用いて 1 8 7 塩基対の P C R 増幅産物を得た。P C R の

5 条件は以下のとおりである。

- | | |
|---------|------------------|
| 反応容量 | : 1 0 0 μ L |
| テンプレート | : 検査試料 1 μ L |
| プライマー | : 各 2 0 p m o l |
| 使用酵素 | : E x T a q |
| 10 反応条件 | : 9 4 °C-3 0 秒 |
| | 5 5 °C-3 0 秒 |
| | 7 2 °C-3 0 秒 |
| | 3 5 サイクル |

反応物はエタノール沈殿法により精製した。

15

(実施例 3 ハイブリダイゼーションおよび検出)

実施例 2 で調製した各試料を 1 2 μ L のハイブリダイゼーション緩衝液 [4 \times SSC (0. 1 5 m o l / L の N a C l と 1 5 m m o l / L のクエン酸ナトリウムを基本溶液として 4 \times はその 4 倍濃度を表す)、0. 2 % SDS、5 0 % ホルムアミド] に溶解し、その 1 0 μ L を実施例 1

20 で作成した核酸アレイに 4 2 °C で 2 時間ハイブリダイズさせた。ハイブリダイズ後、緩衝液 (2 \times SSC、0. 2 % SDS) で 3 7 °C、5 分間洗浄後さらに、緩衝液 (0. 2 \times SSC) で室温、5 分間洗浄後、乾燥し、

A f f i m e t r i x 4 2 8 A r r a y S c a n n e r を用いて蛍

25 光シグナルを検出した。その結果を図 2 ~ 8 に示した。

試料 1 では、G 7 1 R の変異検出チップの G 列のみに、P 2 2 9 Q 変

異検出チップのC列のみに、さらにY 4 8 6 Dの変異検出チップのT列のみにそれぞれハイブリダイズが観察された。これは、何れも正常な配列を有していることを示していた（図2）。

試料2および3では、P 2 2 9 Qの変異検出チップのC列およびY 4 8 6 Dの変異検出チップのT列にハイブリダイズが認められ、それぞれ正常な配列が認められたが、G 7 1 Rの変異検出チップのA列およびG列の両方にハイブリダイズが観察された。これにより、G列にハイブリダイズする正常な配列と、A列にハイブリダイズする変異配列を共に有するヘテロ接合性の変異が確認された（図3、図4）。

10 試料4においては、P 2 2 9 QおよびY 4 8 6 Dの変異検出チップでは何れも正常なハイブリダイズパターンを示したが、G 7 1 Rの変異検出チップのA列のみにハイブリダイズが観察された。これにより、ホモ接合性の変異が確認された（図5）。

試料5では、G 7 1 RおよびY 4 8 6 Dの変異検出チップのハイブリダイズパターンは何れも正常であったが、P 2 2 9 Qにおいては正常なハイブリダイズであるC列とさらにA列にもハイブリダイズが観察された。これにより、ヘテロ接合性の変異が確認された（図6）。

試料6ではG 7 1 RおよびP 2 2 9 Qの変異検出チップに対しては何れも正常なハイブリダイズパターンを示したが、Y 4 8 6 Dの変異検出チップに対しては、正常なハイブリダイズであるT列と変異を示すG列の両方にハイブリダイズが観察された。これにより、ヘテロ接合性の変異が確認された（図7）。

試料7では試料6と異なり、Y 4 8 6 D変異検出チップにおいてG列のみにハイブリダイズが観察された。これにより、ホモ接合性の変異が
25 確認された（図8）。

以上7種の試料と同じ遺伝子配列を持つU G T分子を遺伝子組換えに

より調製し、ビリルビンを基質として測定したときのUGT活性と上記の結果を比較検討した結果、表1のようになり、UGT分子をコードするエキソン5領域の変異、とりわけY486Dの変異を検出することにより、UGT分子の酵素活性を予測することが可能なことが確認された。

- 5 これより薬剤代謝の異常を検査することが可能であることが示された。さらに、エキソン5領域以外のエキソン1～4の領域の変異を合わせて検出することにより、より効果的に薬剤代謝の異常を検査できることが示された。

(表1) DNAチップでの解析結果と対応する遺伝子組換えUGT1

10 A1分子のUGT活性

UGT遺伝子変異	相対UGT活性(グルクロン酸抱合活性)
正 常	100%
G71R (ホモ)	32%
G71R (ヘテロ)	60%
P229Q (ヘテロ)	15%
Y486D (ホモ)	8%
Y486D (ヘテロ)	36%

(実施例4)

- 15 実施例1と同様に操作してエキソン5領域の変異を検出したUGT1 A6分子について、エキソン5領域の変異の解析結果と、対応するその遺伝子組換えUGT1 A6分子のUGT活性を2-アミノ-5-ニトロ-4-トリフルオロメチルフェノールを基質として測定した。その結果を表2に示した。

(表 2) DNAチップでの解析結果と対応する遺伝子組換えUGT1A6分子のUGT活性

UGT遺伝子変異	相対UGT活性(グルクロン酸抱合活性)
正 常	100%
Y485D (ホモ)	>1%

- 5 この結果、UGT1A1のみならず、他のアイソフォームの変異も本発明の方法で検出可能であることが判り、本発明の効果が確かめられた。

産業上の利用可能性

- 10 以上説明したように、本発明のUGT1をコードする共通エクソン領域の変異を検出方法により、多数の存在するアイソフォームを個別に検査することなく、効率的にUGT1遺伝子の変異を検出して、数多い薬剤に対してその代謝の判定、予測および検査を効率的に行うことができる。

請 求 の 範 囲

1. UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ (UGT) をコードする遺伝子のエキソン5領域の変異を検出する工程を含むことを特徴とするUGTの薬剤代謝能に対する検査方法。
5
2. プロモーター領域のTATA boxに存在するTAの繰り返し配列の増加または減少の変異を検出する工程を組み合わせてなる請求の範囲第1項に記載の検査方法。
10
3. UGT1をコードする遺伝子を含む試料を、UGT1A1、UGT1A3、UGT1A4、UGT1A5、UGT1A6、UGT1A7、UGT1A8、UGT1A9およびUGT1A10の各アイソフォーム毎の検査をすることなく、該各アイソフォームに共通の核酸配列を有するエキソン5領域の変異を検出する工程を含む請求の範囲第1項または
15 第2項に記載の検査方法。
4. UGT1A1分子のアミノ酸配列486番目のアミノ酸をコードするUGT遺伝子配列の1456番目の塩基に対応するUGT1A分子の各アイソフォームのエキソン5領域の変異を検出する工程を含む請求の
20 範囲第3項に記載の検査方法。
5. 上記変異の検出工程ともに、UGT分子をコードする遺伝子配列のエキソン1、2、3および4の領域の少なくとも1つの領域の変異を検出する工程を含む請求の範囲第1項～第4項のいずれか1に記載の検査
25 方法。

6. UGT1A1分子のアミノ酸配列71番目のアミノ酸をコードする
UGT遺伝子配列の226番目の変異およびアミノ酸配列229番目の
アミノ酸をコードする遺伝子配列の486番目の変異のうち少なくとも
5 1つの遺伝子配列の変異を検出する工程を含む請求の範囲第5項に記載
の検査方法。

7. 請求の範囲第3項または第4項に記載の塩基置換からなる変異を有
するUGT遺伝子または該変異を含む遺伝子の断片。

10

8. 請求の範囲第1項～第6項のいずれか1に記載の塩基置換の検出方
法に供される被検DNAとしての機能的有効長を有するDNA断片また
は請求の範囲第1項～第6項に記載の塩基置換を検出方法に使用するた
めのプローブとしての機能的有効長を有するDNA断片。

15

9. 配列番号1～3のいずれか1で表される塩基配列を有するUGTに
特異的なオリゴヌクレオチドプローブである請求の範囲第7項または第
8項記載のDNA断片。

20 10. 配列番号1で表される塩基配列を有するプローブと配列番号2お
よび／または3で表される塩基配列を有するプローブを組み合わせ使用
する請求の範囲第5項または第6項に記載の検査方法。

11. 請求の範囲第7項～第9項のいずれか1に記載のオリゴヌクレオ
25 チドプローブまたは請求の範囲第10項に記載の方法に用いるオリゴヌ
クレオチドプローブを同一の装置内に設置した検出装置。

- 1 2. 請求の範囲第 7 項～第 9 項のいずれか 1 に記載のオリゴヌクレオチドプローブの塩基配列の末端が、官能基を介して不溶性支持体に結合して固定化されている核酸チップまたは核酸アレイである請求の範囲第
- 5 1 1 項記載の検出装置
- 1 3. 請求の範囲第 1 1 項または第 1 2 項に記載の装置を用いて薬剤代謝を判定、予測または検査する方法。
- 10 1 4. 請求の範囲第 1 項～第 6 項、第 1 0 項、第 1 3 項、のいずれか 1 に記載の方法に用い、または請求の範囲第 7 項～第 9 項に記載の核酸断片或いは請求の範囲第 1 1 項または第 1 2 項に記載の装置を組み込んだ検査キット。

第1図

G71R				P229Q				Y486D			
A	C	G	T	A	C	G	T	A	C	G	T
●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●

第2図

G71R				P229Q				Y486D			
A	C	G	T	A	C	G	T	A	C	G	T
●	●	○	●	●	○	●	●	●	●	●	○
●	●	○	●	●	○	●	●	●	●	●	○
●	●	○	●	●	○	●	●	●	●	●	○
●	●	○	●	●	○	●	●	●	●	●	○
●	●	○	●	●	○	●	●	●	●	●	○

● : ハイブリダイズ無し

○ : ハイブリダイズ有り

第3図

G71R				P229Q				Y486D			
A	C	G	T	A	C	G	T	A	C	G	T
○	●	○	●	●	○	●	●	●	●	●	○
○	●	○	●	●	○	●	●	●	●	●	○
○	●	○	●	●	○	●	●	●	●	●	○
○	●	○	●	●	○	●	●	●	●	●	○
○	●	○	●	●	○	●	●	●	●	●	○

● : ハイブリダイズ無し

○ : ハイブリダイズ有り

第4図

G71R				P229Q				Y486D			
A	C	G	T	A	C	G	T	A	C	G	T
○	●	○	●	●	○	●	●	●	●	●	○
○	●	○	●	●	○	●	●	●	●	●	○
○	●	○	●	●	○	●	●	●	●	●	○
○	●	○	●	●	○	●	●	●	●	●	○
○	●	○	●	●	○	●	●	●	●	●	○

● : ハイブリダイズ無し

○ : ハイブリダイズ有り

第5図

G71 R				P229Q				Y486D			
A	C	G	T	A	C	G	T	A	C	G	T
○	●	●	●	●	○	●	●	●	●	●	○
○	●	●	●	●	○	●	●	●	●	●	○
○	●	●	●	●	○	●	●	●	●	●	○
○	●	●	●	●	○	●	●	●	●	●	○
○	●	●	●	●	○	●	●	●	●	●	○

● : ハイブリダイズ無し

○ : ハイブリダイズ有り

第6図

G71 R				P229Q				Y486D			
A	C	G	T	A	C	G	T	A	C	G	T
●	●	○	●	○	○	●	●	●	●	●	○
●	●	○	●	○	○	●	●	●	●	●	○
●	●	○	●	○	○	●	●	●	●	●	○
●	●	○	●	○	○	●	●	●	●	●	○
●	●	○	●	○	○	●	●	●	●	●	○

● : ハイブリダイズ無し

○ : ハイブリダイズ有り

第7図

G71R				P229Q				Y486D			
A	C	G	T	A	C	G	T	A	C	G	T
●	●	○	●	●	○	●	●	●	●	○	○
●	●	○	●	●	○	●	●	●	●	○	○
●	●	○	●	●	○	●	●	●	●	○	○
●	●	○	●	●	○	●	●	●	●	○	○
●	●	○	●	●	○	●	●	●	●	○	○

● : ハイブリダイズ無し ○ : ハイブリダイズ有り

第8図

G71R				P229Q				Y486D			
A	C	G	T	A	C	G	T	A	C	G	T
●	●	○	●	●	○	●	●	●	●	○	●
●	●	○	●	●	○	●	●	●	●	○	●
●	●	○	●	●	○	●	●	●	●	○	●
●	●	○	●	●	○	●	●	●	●	○	●
●	●	○	●	●	○	●	●	●	●	○	●

● : ハイブリダイズ無し ○ : ハイブリダイズ有り

1/4

SEQUENCE LISTING

<110> Shiga University of Medical Science

<120> Method for detection of mutation in UGT Gene

<130> GP02-1026PCT

<150> JP P2002-235029

<151> 2002-08-12

<160> 11

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Designed DNA based on UGT1 gene

<220>

<221> misc_feature

<222> (10).. (10)

<223> N is universal base such as A, T, C, G or inosine

<400> 1

tggtaccagn accattcct

19

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Designed DNA based on UGT1 gene

<220>

<221> misc_feature

<222> (9).. (9)

<223> N is universal base such as A, T, C, G or inosine

2/4

<400> 2
tcagagacng agcatTTT

18

<210> 3
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Designed DNA based on UGT1 gene

<220>
<221> misc_feature
<222> (9).. (9)
<223> N is universal base such as A, T, C, G or inosine

<400> 3
taattccng tatgaaa

17

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Designed DNA based on UGT1 gene

<400> 4
otgcagcaga ggggacatga

20

<210> 5
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Designed DNA based on UGT1 gene

<400> 5
aacattatgc ccgagactaa c

21

3/4

<210> 6
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Designed DNA based on UGT1 gene

<400> 6
caaccattc tctacgtg

19

<210> 7
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> 21

<400> 7
agatgcagag ctcaataggt c

21

<210> 8
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Designed DNA based on UGT1 gene

<400> 8
gctggacctg gcagtgttc

19

<210> 9
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Designed DNA based on UGT1 gene

<400> 9

4/4

tttccggtag ccatatgcac a

21

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Designed DNA based on UGT1 gene

<400> 10

ccgcagccca cgacctcacc tggt

24

<210> 11

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Designed DNA based on UGT gene

<400> 11

agaggaaacc aatcacgtcc aagg

24

特許協力条約に基づく国際出願願書

GP02-1026PCT

原本（出願用） - 印刷日時 2003年02月12日（12. 02. 2003）水曜日 15時03分05秒

VIII-5-1	不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て（規則4.17(v)及び51の2.1(a)(v)）	本国際出願に関し、 滋賀医科大学が代表する日本国は、本国際出願の請求項に記載された対象が以下のように開示されたことを申し立てる。
VIII-5-1 (i)	開示の種類	刊行物
VIII-5-1 (ii)	開示の日付：	2002年02月16日（16.02.2002）
VIII-5-1 (iii)	開示の名称：	Eur J Clin Pharmacol (2002) 58:11-14
VIII-5-1 (iv)	開示の場所：	
VIII-5-1 (v)	本申立ては、次の指定国のためになされたものである。：	すべての指定国

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/01475

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12Q1/68, C12N15/09, G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12Q1/68, C12N15/00-15/90

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)
REGISTRY/CA (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	ITO M. et al., Effect of a conserved mutation in uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A1 and 1A6 on glucuronidation of a metabolite of flutamide. Eur.J.Clin.Pharmacol, 2002 April, 58(1), pages 11 to 14	1,3-5,7-14 2,6
X Y	YAMAMOTO K. et al., Contribution of two missense mutations (G71R and Y486D) of the bilirubin UDP glycosyltransferase (UGT1A1) gene to phenotypes of Gilbert's syndrome and Crigler-Najjar syndrome type II. Biochim.Biophys.Acta., 28 April, 1998 (28.04.98), 1406(3), p.267-73	7-9,11,12,14 1-6,10,13



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
21 April, 2003 (21.04.03)

Date of mailing of the international search report
06 May, 2003 (06.05.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

PCT/JP03/01475

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ANDO Y. et al., Polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferase gene and irinotecan toxicity: a pharmacogenetic analysis. Cancer Res., 15 December, 2000 (15.12.00), 60(24), pages 6921 to 6926	1-14
Y	ANDO Y. et al., Polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferase and pharmacokinetics of irinotecan. Ther Drug Monit, 2002 February, 24(1), pages 111 to 116	1-14
Y	OWENS I.S. et al., The novel UGT1 gene complex links bilirubin, xenobiotics, and therapeutic drug metabolism by encoding UDP-glucuronosyltransferase isozymes with a common carboxyl terminus. J.Pharmacokinet Biopharm, 1996 October, 24(5), pages 491 to 508	1-14
P,X	JINNO H. et al., Glucuronidation of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38), an active metabolite of irinotecan (CPT-11), by human UGT1A1 variants, G71R, P229Q, and Y486D. Drug Metab Dispos, 2003 January, 31(1), pages 108 to 113	1-14
P,X	GAGNE J.F. et al., Common human UGT1A polymorphisms and the altered metabolism of irinotecan active metabolite 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin(SN-38). Mol.Pharmacol., 2002 September, 62(3), pages 608 to 617	1-14
A	BIOSIS Accession No.2001:45723 CHANG H.C. et al., Metabolism of flutamide in diet control Fischer 344 and Brown Norway X F 344 rats, and its hydroxylation and conjugation by human CYP450s and UDP-glucuronosyltransferases. Journal of Food and Drug analysis, 2000, 8(3), 166-173	1-14

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12Q1/68, C12N15/09, G01N33/50

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12Q1/68, C12N15/00-15/90

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)
REGISTRY/CA (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	ITO M et al., Effect of a conserved mutation in uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A1 and 1A6 on glucuronidation of a metabolite of flutamide. Eur J Clin Pharmacol, 2002 Apr, 58(1), p. 11-14	1, 3-5, 7-14 2, 6
X Y	YAMAMOTO K et al., Contribution of two missense mutations (G71R and Y486D) of the bilirubin UDP glycosyltransferase (UGT1A1) gene to phenotypes of Gilbert's syndrome and Crigler-Najjar syndrome type II. Biochim Biophys Acta, 1998 Apr 28, 1406(3), p. 267-73	7-9, 11, 12, 14 1-6, 10, 13

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

21.04.03

国際調査報告の発送日

06.05.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

伏見 邦彦

印

4B

9838

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	ANDO Y et al., Polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferase gene and irinotecan toxicity: a pharmacogenetic analysis. Cancer Res, 2000 Dec 15, 60(24), p. 6921-6926	1-14
Y	ANDO Y et al., Polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferase and pharmacokinetics of irinotecan. Ther Drug Monit, 2002 Feb, 24(1), p. 111-116	1-14
Y	OWENS I S et al., The novel UGT1 gene complex links bilirubin, xenobiotics, and therapeutic drug metabolism by encoding UDP-glucuronosyltransferase isozymes with a common carboxyl terminus. J Pharmacokinet Biopharm, 1996 Oct, 24(5), p. 491-508	1-14
PX	JINNO H et al., Glucuronidation of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38), an active metabolite of irinotecan (CPT-11), by human UGT1A1 variants, G71R, P229Q, and Y486D. Drug Metab Dispos, 2003 Jan, 31(1), p. 108-113	1-14
PX	GAGNE J F et al., Common human UGT1A polymorphisms and the altered metabolism of irinotecan active metabolite 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38). Mol Pharmacol, 2002 Sep, 62(3), p. 608-617	1-14
A	BIOSIS Accession No. 2001:45723 CHANG H C et al., Metabolism of flutamide in diet control Fischer 344 and Brown Norway X F 344 rats, and its hydroxylation and conjugation by human CYP450s and UDP-glucuronosyltransferases. Journal of Food and Drug analysis, 2000, 8(3), 166-173	1-14